PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5:

C12N 5/24, A61K 39/395

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 91/00342

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

10. Januar 1991 (10.01.91)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP90/00976

A1

(22) Internationales Anmeldedatum:

20. Juni 1990 (20.06.90)

(30) Prioritätsdaten:

P. 39 21 211.4

28. Juni 1989 (28.06.89)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IDT AG FUR IN VIVO DIAGNOSTIK UND THERAPIE [CH/ CH]; Lagerstr. 107, CH-8001 Zurich (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WATZEK, Carl [DE/DE]; Wichernstr. 11, D-8120 Weilheim (DE). PRIDUN, Nestor [AT/AT]; Slatingasse 2, A-1103 Wien (AT).

(74) Anwalt: DEUFEL-SCHÖN-HERTEL-LEWALD; Isartorplatz 6, D-8000 München 2 (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent)*, DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES

(54) Bezeichnung: HERSTELLUNGSVERFAHREN FUR HUMANE MONOKLONALE ANTIKÖRPER

(57) Abstract

The process of the invention comprises the following steps: (a) isolation and preparation of cells exhibiting antigens, TH and B cell precursors from tumour-infiltrated people, those infected with procaryotic or eucaryotic exciters, especially viruses, or those with a hereditary disease; (b) activation of the TH and B cell precursors of (a) by bonding to the cells of (a) exhibiting antigens; (c) isolation and preparation of B cells from tumour-infiltrated people, those infected with procaryotic or eucaryotic exciters, especially viruses, those with a serious disease or healthy people; (d) activating the B cells of (c) by bonding to the antigen-activated TH and B cell precursors of (b), and (e) cloning the activated B cells of (d).

(57) Zusammenfassung

Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt folgende Verfahrensschritte: (a) Isolierung und Aufbereitung von antigenpräsentierenden Zellen, TH-Zellvorläufern und B-Zellvorläufern aus tumorinfiltrierten, mit prokaryontischen oder eukaryontischen Erregern, insbesondere Viren, insizierten oder eine erbliche Krankheit ausweisenden Personen; (b) Aktivierung der TH-Zellvorläuser und B-Zellvorläuser von (a) durch Anbindung an die antigenpräsentierenden Zellen von (a); (c) Isolierung und Ausbereitung von B-Zellen aus tumorinsiltrierten, mit prokaryontischen oder eukaryontischen Erregern, insbesondere Viren, insizierten, eine erbliche Krankheit ausweisenden oder gesunden Personen; (d) Aktivierung der B-Zellen von (c) durch Anbindung an die antigenaktivierten TH-Zellvorläuser und B-Zellvorläuser von (b), und (e) Klonierung der aktivierten B-Zellen von (d).

BENENNUNGEN VON "DE"

Bis auf weiteres hat jede Benennung von "DE" in einer internationalen Anmeldung, deren internationaler Anmeldetag vor dem 3. Oktober 1990 liegt, Wirkung im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland mit Ausnahme des Gebietes der früheren DDR.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | · | |
|--|---|---|---|--|
| Österreich | ES | Speniun | MG | Madagaskar |
| Australica | PI | Fineland | ML | Mali |
| | PR | Frankreich | MR | Mauritanica |
| | CA | Gabon | MW | Malawi |
| | CB | Vereinigus Königreich | NL. | Niederlande |
| | CR | Griechenland | NO | Norweges |
| _ | HU | Ungarn | RO | Ruminien |
| | _ | | \$ D | Sudan |
| | | | SE | Schweden |
| | | | SN | Sunugal |
| The second secon | | | SU | Soviet Union |
| - | | • | TD | Tached |
| | | | TC | Tope |
| | | | | |
| Deutschland, Bundesrepublik | W | Luscaturg | us . | Versinigte States von Amerika |
| Ednomark | MC | Menae | | |
| | Australiun Barbadun Belgiun Berkina Finasi Bulgariun Bunian Brasiliun Brasiliun Kanada Zentralu Afrikáninchu Hepublik Kongo Schweis Kamarun Deutschland, Bundearepublik | Österreich ES Australien P1 Barbalus PR Belgien GA Burkins Fisses GB Bulgarien GR Benin HU Franklien 17 Kantalis JP Zentrale Afrikánische Republik KP Kongo KR Schweis LJ Deutschland, Bundearepublik LU Deutschland, Bundearepublik LU | Osterreich Australien Pl Finaland Barbadus Belgien GA Gabon Burkina Franci Burkina Franci Bulgarien Bulgarien Bulgarien Bulgarien Bulgarien Bulgarien Bulgarien Bulgarien HU Ungarn IT Italien JP Japan Zentrale Afrikanische Republik KOngo KR Republik Korus Kongo KR Republik Korus Kongo Li Linchternstein Deutschland, Bunderepublik LU Lanenturg | Österreich ES Spanken MG Australien PI Finaland ML Barbadun PR Frankreich MR Belgien GA Gabon MW Burkina Frasco GB Vereinigtes Königreich ML Bulgarien GR Orischenland NO Beallen HU Ungarn RO Brasillen IT Italien SD Kanada JP Japan SE Zentrale Afrikanische Republik KP Demykratusche Volksrepublik Korus SN Kongo KR Republik Kores SU Kongo LI Lischtenstein TD Kamerun LK Sri Lanks TG Deutschland, Bunderrepublik LU Lischtenstein |

1

HERSTELLUNGSVERFAHREN FUR HUMANE MONOKLONALE ANTIKORPER

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern und ihre Verwendung.

Der Nachweis von Tumorantigenen, bakteriellen- oder viralen Antigenen sowie von durch Mutation veränderten humanen Proteinen, die im Serum, im Urin oder in Geweben des Menschen in extrem niedrigen Konzentrationen vorliegen, erfordert Verfahren, die nicht nur sehr sensitiv, sondern auch hochspezifisch sind. Üblicherweise werden hierfür Verfahren, wie ein Radioimmunoassay (RIA), Enzymimmunoassay (EIA, ELISA) oder Immunfluoreszenzassay (IFA) verwendet. In ihnen werden Antigene durch ihre spezifischen, indirekt markierten Antiseren nachgewiesen. Monoklonale Antikörper, die hier ebenfalls zum Nachweis von Antigenen verwendet werden, werden direkt oder auch indirekt markiert.

Es hat sich nun allerdings gezeigt, daß oftmals aus Tieren gewonnene Antiseren, insbesondere gegen Viren, nicht ausreichend sensitiv sind. Sie weisen dann häufig nur Antikörper gegen einige wenige der viralen Antigene auf. Auch ist es vielfach nur möglich, monoklonale Antikörper gegen einzelne, nicht aber gegen alle Antigene eines Virus aus immunisierten Tieren zu erhalten.

25

30

35

20

Aufgrund solcher Erfahrungen versucht man nun auch Antikörper direkt aus B-Zellen von infizierten oder infiltrierten Personen zu isolieren und zu klonieren. Die Gewinnung solcher humaner monoklonaler Antikörper erweist sich jedoch als äußerst schwierig. Bereits das permanente Inkulturhalten von humanen B-Zellen verursacht große Probleme. So werden Versuche beschrieben, humane B-Zellen durch Virustransformation zu immortalisieren. Auch werden humane B-Zellen mit Maus-Myelomzellen fusioniert. Bis jetzt erwiesen sich diese Versuche jedoch nicht als geeignet, um

B-Zellen so zu kultivieren, daß humane monoklonale Antikörper hergestellt werden könnten.

Auch führten Versuche, in denen Chromosomen aus von humanen B-Zellen und Maus-Myelomzellen gebildeten Hybridomazellen isoliert und in Mikroorganismen transfiziert wurden, nicht zur gewünschten Expression von humanen monoklonalen Antikörpern.

Darüberhinaus ist zu bemerken, daß in Versuchen mit Hybridomazellen generell die Gefahr besteht, daß Chromosomenteile und somit auch Abschnitte von Immunglobulingenen verloren gehen. Unspezifisch bindende humane monoklonale Antikörper sind deshalb häufig die Folge.

15

5

Im weiteren werden Versuche beschrieben, humane Antikörper mit definierten Antigen-Bindungsregionen herzustellen, d.h. Antikörper zu konstruieren, deren konstante und variable Regionen von humanen Antikörpern stammen, während ihre Antigen-Bindungsregionen genau definiert und mittels Rekombination eingebracht werden. Solche chimären Antikörper finden Anwendung in Patentschriften und relevanten Publikationen über die der Herstellung potentieller AIDS- und Tumor-Therapeutika.

25

20

Zu bemerken ist allerdings, daß bei der Klonierung von chimären Antikörpern häufig Chromosomenverluste auftreten, so daß auch hier vielfach nur unspezifisch bindende humane monoklonale Antikörper erhalten werden.

30

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, durch das spezifische humane monoklonale Antikörper hergestellt werden können. 10

20

35

- Erfindungsgemäß wird dies in einem Verfahren erreicht, das folgende Verfahrensschritte umfaßt:
- a) Isolierung und Aufbereitung von antigenpräsentierenden
 Zellen, T-Helfer(T_H)-Zellvorläufern und
 B-Zellvorläufern aus tumorinfiltrierten, mit
 prokaryontischen oder eukaryontischen Erregern,
 insbesondere Viren, infizierten oder eine erbliche
 Krankheit aufweisenden Personen,

b) Aktivierung der T_H -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer von a) durch Anbindung an die antigenpräsentierenden Zellen von a),

- c) Isolierung und Aufbereitung von B-Zellen aus tumorinfiltrierten, mit prokaryontischen oder eukaryontischen Erregern, insbesondere Viren, infizierten, eine erbliche Krankheit aufweisenden oder gesunden Personen,
 - d) Aktivierung der B-Zellen von c) durch Anbindung an die antigenaktivierten T_H-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer von b), und
- e) Klonierung der aktivierten B-Zellen von d).

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden antigenpräsentierende Zellen vorzugsweise aus der Pleuraflüssigkeit der angegebenen Personen isoliert. Dazu wird diese Flüssigkeit mit einem Puffer, vorzugsweise Hanks, verdünnt und zentrifugiert. Die pelletierten Zellen werden dann in Medium, das hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum enthält, aufgenommen und inkubiert.

1 Vorzugsweise enthält das Medium auch Stoffe, durch die-Zellen zur Proliferation angeregt werden. Als bevorzugte Stoffe werden dabei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die aus den in der DE-OS 38 11 692 beschriebenen Parbstoffmolekülen 5 A und B erhalten werden. Unter dem Farbstoffmolekül A versteht man das Kondensationsprodukt von Flavoprotein. nämlich jenes von Riboflavin-5'-monophosphatnatriumsalz mit alpha-Liponsäure, das nach Zugabe von Jodacetamid und Dialysieren nach Destillation zurückbleibt. Als 10 Farbstoffmolekül B versteht man das weitere Umsetzungsprodukt des Destillationsrückstandes mit einer Reaktionslösung aus 1,4-Bis(4-methyl-5-phenyl-2-oxazolyl)-benzol und p-Terphenyl in einem organischen Lösungsmittel, dem Maleinsäureanhydrid 15 zugesetzt ist, und das nach mehrstündigem Stehen auf einen neutralen pH-Wert eingestellt und in üblicherweise gereinigt ist. Zellen, die die angesprochenen Pluoreszenzfarbstoffe aufgenommen haben, erfahren nicht nur eine Wachstums-Stimulation, sondern werden auch 20 fluoreszenzmarkiert und somit unter dem Mikroskop erkennbar. Erfindungsgemäß werden die angesprochenen Fluoreszenzfarbstoffe bevorzugt gekoppelt, beispielsweise mit Proteinen oder Peptiden, eingesetzt. Sie werden dann als

25

30

35

Zellen, die sich bei der Inkubation mit dem angesprochenen Medium nicht festsetzen, werden durch mehrmaliges Waschen entfernt und von den adhärenten Zellen werden kontaminierende Fibroblasten, Makrophagen und Mesothelzellen abgetrennt. Aus fluoreszenzmarkierten antigenpräsentierenden Einzelzellen werden schließlich Klone herangezogen. Dazu wird ein serumfreies, die Proliferation antigenpräsentierender Zellen förderndes Medium (nachstehend als serumfreies, antigenstimulierendes Medium bezeichnet) verwendet. Als Medium kann hierfür beispielsweise das

carriergebundene Fluoreszenzfarbstoffe bezeichnet.

-4a-

handelsübliche Basismedium IMDM (Iscoves modified Dulbecco medium) ohne L-Glutamin herangezogen werden. Diesem Medium werden Faktoren wie TCGF (Interleukin 2) und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor) zugegeben.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden T_H-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer vorzugsweise aus Venenblut der angegebenen Personen isoliert. Die Zellen werden dabei durch mehrere Zentrifugationsschritte gesammelt und auf mit Blutgruppenseren und GM-CSF (vorstehend angegeben)

beschichteten Petrischalen ausplattiert. Nicht-adhärente Zellen werden ausgewaschen, während die festsitzenden Zellen in serumfreiem, antigenstimulierenden Medium (vorstehend angegeben) resuspendiert und aufbewahrt werden.

5

10

15

Die T_H-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer werden durch Anbindung an die antigenpräsentierenden Zellen aktiviert. Die Aktivierung verläuft in drei Phasen. Nach der Anbindung der T_H-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer an die antigenpräsentierenden Zellen wird IL-1 (Interleukin 1) gebildet. Dies führt zusammen mit der Stimulierung durch das Antigen zur Ausbildung von IL-2 Rezeptoren auf den T_H-Zellvorläufern. T_H-Zellvorläufer werden zur Freisetzung von IL-2 angeregt, wodurch die Proliferation der antigenaktivierten B-Zellvorläufer induziert wird.

Erfindungsgemäß werden T_H-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer vorsichtig mit fluoreszenzmarkierten antigenpräsentierenden Zellen gemischt und inkubiert. Nicht-adhärente Zellen werden ausgewaschen, während die 20 festsitzenden Zellen in serumfreies, die Proliferation antigenpräsentierender Zellen nicht-förderndes Medium (nachstehend als serumfreies, nicht-antigenstimulierendes Medium bezeichnet) überführt und in diesem inkubiert werden. Als Medium kann beispielsweise das handelsübliche 25 Basismedium IMDM (Iscoves modified Dulbecco medium) ohne L-Glutamin verwendet werden. Diesem Medium werden Paktoren wie LAF (Interleukin 1), TRF (T-cell replacing factor) und GM-CSF (vorstehend angegeben) zugegeben. Unter kurzer Einwirkung von UV-Licht und der Wegnahme des CO₂-Druckes 30 werden die antigenaktivierten T_{μ} -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer von den antigenpräsentierenden Zellen abgelöst. Anschließend werden die antigenaktivierten Zellvorläufer abzentrifugiert und in serumfreiem, nicht-antigenstimulierenden Medium (vorstehend angegeben) 35 resuspendiert und aufbewahrt.

15

20

25

30

3**5**

Zur Aktivierung von B-Zellen werden diese an die antigenaktivierten T_H-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer angebunden. Die B-Zellen reifen dann zu antikörperproduzierenden(-sezernierenden) Zellen (Plasmazellen) aus. Reife B-Zellen können dabei von unreifen B-Zellen durch Inkubation mit einem gegen ihr Oberflächenimmunuglobulin gerichteten Antikörper unterschieden werden. Reife B-Zellen synthetisieren ihr Oberflächenimmunuglobulin innerhalb von 24 h neu, während unreife B-Zellen dazu nicht in der Lage sind.

Erfindungsgemäß werden B-Zellen vorzugsweise aus Venenblut der angegebenen Personen isoliert. Die Zellen werden gewaschen, in serumfreiem, nicht-antigenstimulierenden Medium, dem vorzugsweise zur Proliferations-Stimulierung der Zellen der vorstehend angegebene Fluoreszenzfarbstoff zugegeben wird, inkubiert, anschließend zentrifugiert und gewaschen. Die pelletierten Zellen werden erneut in gleichem Medium aufgenommen und vorsichtig mit antigenaktivierten Tu-Zellvorläufern und B-Zellvorläufern gemischt und dann inkubiert. Durch das Einwirken von UV-Licht und dem CO2-Druckabfall werden die antigenaktivierten Vorläuferzellen abgelöst. Sie werden abzentrifugiert, während die festsitzenden aktivierten B-Zellen mehrmals in Medium gewaschen, zentrifugiert und erneut in Medium resuspendiert werden. Die aktivierten B-Zellen werden dann in Tüpfel von Mikrotiterplatten eingebracht und inkubiert. Die Platten werden zentrifugiert und nachdem Makrophagen und restliche Zellvorläufer entfernt sind, werden die aktivierten B-Zellen nochmals mit dem vorstehend angegebenen Fluoreszenzfarbstoff markiert und 8 Tage inkubiert. Alle zwei Tage wird die Antikörperproduktion überprüft. Dazu . werden die Überstände der Tüpfel getestet. B-Zellen, deren Überstände positiv sind, werden Freßzellen oder Makrophagen zugegeben, wodurch die B-Zellen zur Proliferation angeregt werden. Nach Ausdifferenzierung zu antikörpersezernierenden

-7-

Plasmazellen werden diese kloniert. Dazu werden die in den positiven Überständen vorliegenden Zellen vereinzelt und kultiviert.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht es, humane monoklonale Antikörper herzustellen, ohne daß dabei Rekombinations- oder Zellfusionsverfahren angewandt werden müßten. So können die bei diesen Verfahren oftmals eintretenden Chromosomenverluste vermieden werden, wodurch auch die damit verbundene Gefahr, unspezifisch bindende Antikörper zu erhalten, ausgeschlossen werden kann.

15

20

35

Das erfindungsgemäße Verfahren weist ferner den großen Vorteil auf, daß nicht wie üblich Antikörper nur von einer begrenzten Zahl verschiedener, reifer humaner B-Zellen (Plasmazellen) erhalten werden, sondern daß durch die Verwendung von T_H-Zellvorläufern und B-Zellvorläufern noch das Gesamt-Potential aller in einer Person möglicher Antikörpervariationen ausgenutzt werden kann. Die Möglichkeit verschiedenste Antikörper zu erhalten, ist damit gegeben. So gelang es beispielsweise auch Antikörper gegen das HIV-Oberflächenprotein gp 120 und seinen Vorläufer gp 160 zu isolieren.

Erfindungsgemäß hergestellte humane monoklonale Antikörper besitzen wie bereits angesprochen die Fähigkeit, spezifisch zu binden. Sie eignen sich also zum Nachweis ganz spezieller Antigene und damit zur Diagnose von Tumor-, erblichen oder durch prokaryontische oder eukaryontische Erreger, insbesondere Viren, hervorgerufenen Erkrankungen. Als virale Erkrankungen sind dabei besonders AIDS, Multiple Sklerose und Alzheimerische Krankheit gemeint, während als Tumorerkrankung insbesondere das Kleinzellen-Lungenkarzinom angesprochen ist.

PCT/EP90/00976

Erfindungsgemäß hergestellte humane monoklonale Antikörper eigenen sich darüberhinaus auch für therapeutische Maßnahmen, da aufgrund fehlender wirtsfremder Determinanten in behandelten Patienten keine gegen die erfindungsgemäß hergestellten Antikörper gerichtete Antikörperproduktion stattfindet.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

10

Beispiel 1

Herstellung eines Fluoreszenzfarbstoffes.

Die kristallinen Farbstoffmoleküle A und B gemäß DE-OS 38 11 692 (Seite 2 und Anspruch 1) werden getrennt in PBS Puffer im Ultraschallbad bis zur klaren Lösung behandelt. Je 4 mmol der Farbstoffmoleküle A und B werden in 100 ml einer 0,1 N HCl unter tropfenweiser Zugabe einer 1% igen NaNO2-Lösung unter ständigem Rühren bei 4°C diazotiert.

Zur Vermeidung eines Überschusses von ${\rm HNO}_2$ wird das Reaktionsgemisch mit Stärke-Jodid-Teststreifen kontrolliert. Liegt freies ${\rm HNO}_2$ vor, zeigt der Teststreifen eine blau-schwarze Färbung.

Nach Beendigung der Reaktion wird das Farbstoff-Konjugat 1 h bei 4°C dialysiert und steril filtriert.

30

25

Der gebrauchsfertige Fluoreszenzfarbstoff wird auf pH -7,5 eingestellt und im Kühlschrank aufbewahrt.

1 Beispiel 2

Herstellung von carriergebundenem Pluozaszenzfarbstoff.

- Durch Kopplung des gebrauchsfertigen Fluoreszenzfarbstoffes von Beispiel 1 mit Proteinen, Peptiden oder anderen Substanzen wird ein carriergebundener Fluoreszenzfarbstoff erhalten.
- Die Kopplungsreaktion wird bei 4°C und einem pH-Wert von 9,0 durchgeführt.

 Von einem Protein mit einem Molekulargewicht von 155.000 (IgG) werden 0,08 mmol zur Kopplung benötigt. Diese Proteinmenge wird in 100 ml Borat-Puffer, oder als
 Alternative in Carbonat-Puffer, pH -9,0 unter leichtem Rühren gelöst und der gebrauchsfertige Fluoreszenzfarbstoff von Beispiel 1 langsam unter ständiger pH-Kontrolle und leichtem Rühren an der Innenwand des Reaktionsgefäßes ablaufend der Proteinlösung zugegeben. Nach beendeter zugabe wird die Reaktionslösung 2 h bei 4°C unter häufiger pH-Kontrolle gerührt. Über Nacht wird die Reaktionslösung im

Die Kopplung kann alternativ auch mittels einer Gleichgewichtsdialyse vorgenommen werden. Zwei Dialysekammern mit unterschiedlichen Membranen werden mit einem dazwischenliegenden Membranfilter Zusammengefügt und luftdicht verschlossen.

Kühlschrank stehengelassen und danach 12 h gegen 5 - 7 L 0,15 M NaCl dialysiert. Nach Abschluß der Dialyse wird der

pH-Wert auf 7,5 eingestellt.

In die Kammer, deren Membran, die Diffusion des gebrauchsfertigen Fluoreszenzfarbstoffes, nicht aber die des

30

25

-10-

Proteins oder Peptides erlaubt, wird die Proteinlösung eingebracht, in die andere Kammer der gebrauchsfertige Fluoreszenzfarbstoff.

Das Gleichgewicht ist erreicht, wenn die Konzentration des freien Proteins auf beiden Seiten gleich ist. Die Messung von freiem und gebundenem Protein erfolgt im Pluorometer. Die Absorptions- und Emissionsspektren zeigen freie und gebundene Proteinmengen auf.

0

5

Hyaluronidase (MG 89.000) stellt einen wichtigen Diffusionsfaktor zum Einbau von Proteinen, Peptiden und anderen Substanzen in lebende Zellen dar.

In 100 ml gebrauchsfertigen Fluoreszenzfarbstoff von Beispiel 1 wird 1 ml gelöste Hyaluronidase (in 0.9 % NaCl) pipettiert. Dann wird das Reaktionsgemisch 10 min bei 37°C stark gerührt, auf 4°C abgekühlt, dialysiert und auf pH -7,5 eingestellt. Für den Zelleinbau werden bestimmte Proteine, Peptide oder andere Substanzen mit dem gebrauchsfertigen

Fluoreszenzfarbstoff von Beispiel 1 gekoppelt. Die Einführung in die Zellen erfolgt nach den Anwendungsvorschriften "Gen Pulser TM-Transfektionsgerät, Bio-Rad-Lab., Richmond, CA., USA.

:5

0

Beispiel 3

Isolierung und Aufbereitung antigenpräsentierender Zellen aus humaner Pleuraflüssigkeit.

0

5

Pleuraflüssigkeiten von Tumor- oder HIV-Patienten werden zur Gewinnung antigenpräsentierender Zellen verwendet.

- Die Pleuraflüssigkeit wird zentrifugiert und der erhaltene Zellniederschlag mit modifzierter Hanks Lösung gewaschen, zentrifugiert und zu 3 ml Aliquots abgefüllt.
- Die präparierten Zellen (Aliquots) werden im Medium M 199, das mit 2%igem hitzeinaktivierten fötalen Kälberserum und 100/ul Fluoreszenzfarbstoff (von Beispiel 1) ergänzt ist, resuspendiert und dann in Kulturflaschen überführt und 24 h kultiviert. Danach werden nicht-adhärente Zellen ausgewaschen und festsitzende markierte Zellen mit 0,25 M
- ausgewaschen und festsitzende markierte Zellen mit 0,25 M EDTA, pH 7,5 behandelt, um kontaminierende Fibroblasten, Makrophagen und Mesothelzellen zu entfernen.

Spezifische Zellen werden dann in serumfreies,
antigenstimulierendes Medium überführt. Es handelt sich um
das Basismedium - IMDM (Iscoves modified Dulbecco medium),
ohne L-Glutamin, das mit Faktoren wie 1 U/ml TCGF,
0.1/ul/ml GM-CSF und 10/ul/ml Pluoreszenzfarbstoff (von
Beispiel 1) ergänzt wird. Die erhaltenen
fluoreszenzmarkierten Klone werden in 100/ul Aliquots in

flüssigem Stickstoff eingelagert.

Beispiel 4

Belepiel

25

Isolierung und Aufbereitung humaner T_H -Zellvorläufer und B-Zell-Vorläufer.

T_H-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer werden nach dem bekannten "buffy coat"-Verfahren aus heparinisiertem Venenblut von virusinfizierten oder tumorinfiltrierten Personen mit handelsüblichen Zentrifugationsmedien isoliert, gewaschen und in mit humanen A und B Blutgruppenseren beschichteten Petrischalen 6 h in feuchter Kammer bei 37°C inkubiert. Die Petrischalen waren zusätzlich mit GM - CSF (100,ul 1:10 und 100,ul 1:500)

beschichtet, wobei das Volumen dem der Verwendung von Blütgruppenseren entsprach.

Nicht adhärente Zellen werden ausgewaschen und die festsitzenden Zellen bis zur Wiederverwendung in serumfreiem, antigenstimulierenden Medium (siehe Beispiel 3) resuspendiert und im Kühlschrank aufbewahrt.

10 Beispiel 5

25

30

Isolierung und Aufbereitung humaner B-Zellen.

B-Zellen von HIV-infizierten oder tumorinfiltrierten

Personen werden nach dem bekannten

Picoll-Hypaque-Gradientenzentrifugations-Verfahren isoliert,

gewaschen und 1 h bei 37°C unter Zugabe von 100 ul

Pluoreszenzfarbstoff von Beispiel 1 in serumfreiem,

nicht-antigenstimulierenden Medium inkubiert. Es handelt

sich um das Basismedium-IMDM (Iscoves modified Dulbecco

medium), ohne L-Glutamin, dem Faktoren wie 1 U/ml

LAF, 1 ul/ml TRF, 0,1 ul/ml GM-CSF und 10 ul/ml

Pluoreszenzfarbstoff (von Beispiel 1) zugegeben werden.

Anschließend wird 5 min bei 500 g zentrifugiert.

Der Zellniederschlag wird im Medium resuspendiert und die Zellsuspension wird dann auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und aufbewahrt. Bei 9 - 20 % Fluoreszenzfarbstoff im Medium werden Zellzahlen von 4.85×10^6 bis 5.36×10^6 Zellen erreicht. Farbstoffkonzentrationen unterhalb von 50 % haben keinen negativen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen.

Beispiel 6

35 Anbindung humaner antigenpräsentierender Zellen an humane $T_{\rm H}$ -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer.

1 100/ul fluoreszenzmarkierte antigenpräsentierende Zellen werden mit 100/ul TH-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer gemischt und 60 min bei 37°C und 5 % CO2 inkubiert. Danach werden nicht-adhärente Zellen ausgewaschen. Die festsitzenden Zellen werden in serumfreies, nicht-antigenstimulierendes Medium (siehe Beispiel 5) überführt, 90 min bei 40°C inkubiert und dann zentrifugiert. Unter kurzer Einwirkung von UV-Licht und Luftdruckschwankungen lösen sich die antigenpräsentierenden Zellen vollständig von den antigenaktivierten TH-Zellvorläufern und B-Zellvorläufern ab.

Nach einer Zentrifugation werden die antigenaktivierten Zellvorläufer in serumfreiem, antigenstimulierenden Medium (siehe Beispiel 3) resuspendiert und bis zu ihrem Gebrauch aufbewahrt.

Beispiel 7

20

15

Anbindung antigenaktivierter humaner T_H Zellvorläufer- und B-Zellvorläufer an humane B-Zellen

B-Zellen werden, wie in Beispiel 5 beschrieben, vorbehandelt.

50 ul fluoreszenzmarkierte, antigenaktivierte

TH-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer werden mit 50 ul

vorbehandelte B-Zellen vorsichtig gemischt und 60 min bei

37°C und 5 % CO2 inkubiert. Nichthaftende Zellen werden

mit serumfreiem, nicht-antigenstimulierenden Medium (siehe

Beispiel 5) ausgewaschen. Adhärente Zellen werden in

serumfreiem, nicht-antigenstimulierendem Medium 90 min

W() 91/00342

bei 40°C und 5 % CO2 inkubiert. Anschließend findet eine kurze Einwirkung von UV-Licht (360-420 nm) und ein Druckabfall statt. Die antigenaktivierten, TH-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer werden vollständig von den B-Zellen abgelöst. Aus dem Überstand werden die antigenaktivierten 5 T..-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer abzentrifugiert. Nachdem ferner Makrophagen und restliche Zellvorläufer entfernt sind, werden die B-Zellen nochmals mit 100,ul des Fluoreszenzfarbstoffes (von Beispiel 1) markiert, dann aliquotiert und bei -20°C bis zu ihrem Gebrauch eingelagert 10 oder in Tüpfel von Mikrotiterplatten (1x10 2 Zellen/ml und 2x10⁹ Zellen/ml) überführt und 8 Tage bei 37°C und 5 % CO2 inkubiert. Alle zwei Tage wird die Antikörperbildung überprüft.

Nach Stimulation durch Freßzellen oder Markophagen proliferieren die B-Zellen und differenzieren als Klone zu antikörpersezernierenden Plasmazellen aus.

20

15

Beispiel 8

Klonierung der antikörpersezernierenden Plasmazellen

Alle Tüpfel mit positivem Überstand werden gesammelt. Je nach Wahl werden 10⁸ Freßzellen/ml oder 4x10⁶ Makrophagen/ml in die Tüpfel der Mikrotiterplatten eingebracht. Die im positiven Überstand vorliegenden Zellen werden gezählt. Für die Klonierung sind 10³ Zellen ausreichend.

-15-

30 Zellen werden in 1 ml Medium von Beispiel 7 suspendiert und dann in 0,1 ml Aliquots ausplattiert. Die restlichen Zellen werden auf 10 Zellen/ml und dann so weiter bis 3 Zellen/ml eingestellt. Alle in Tüpfeln verteilten Zellen werden bei 37°C in feuchter Kammer inkubiert.

Aufbereitung von humanen Preßzellen und Makrophagen.

20 ml Frischblut werden mit serumfreiem, nicht-antigenstimulierenden Medium (siehe Beispiel 5) 10 verdünnt und nach bekannten Verfahren mit Picoll 15 min bei 500 g zentrifugiert. Rote Blutzellen und Polymorphe befinden sich dann am Röhrchenboden. Periphere einkernige Blutzellen, so auch Monozyten liegen in der Zwischenphase. Diese Phase wird vorsichtig abgesaugt und mit demselben Volumen an dem 15 Medium von Beispiel 5 versetzt und 5 min bei 500 g zentrifugiert. Der Zellniederschlag wird dann im Medium resuspendiert, gezählt und auf 3x10⁷ Zellen/ml eingestellt. Das Gesamtvolumen sollte 10 ml nicht überschreiten. Diesem wird 1 ml Pluoreszenzfarbstoff von 20 Beispiel 1 zugegegeben. Die Zellen werden dann mit Medium verdünnt und mit 5x10⁴ Zellen/Tüpfel ausplattiert.

25 Beispiel 9

Aktivitätstest von erfindungsgemäß hergestellten HIV-Antikörpern gp 120/160.

30 Seren von 5 seropositiven/viruspositiven Patienten, 5 seropositiven/virusnegativen Patienten und 5 Normalpersonen werden isoliert und aufbereitet.

-16-

Jeweils 200 ul aus diesen 15 Humanseren werden in je 3 Reihen einer mit HIV-Antigen beschichteten kommerziellen Mikrotiterplatte pipettiert und 1 h bei RT inkubiert und dann gewaschen. Jeweils 50 ul unverdünnter, 1:100

verdünnter, 1:500 verdünnter und 1:1000 verdünnter fluoreszenzmarkierter HIV-Antikörper gp 120/160 werden zugegeben, bevor 1 h bei RT inkubiert und dann gewaschen wird. Nach Zugabe von 100/ul Blockierungslösung (Sterilmolke) wird die Mikrotiterplatte 15 min

10 stehengelassen, dann gewaschen und gemessen.

Auswertung:

Für die Auswertung von Ergebnissen im unteren Normalbereich bieten sich folgende Auswertungen an:

Regressionsmethode - einfach linear und die gerichtete lineare Regression,
Splite Interpolation und polygonale Interpolation.

Gerät-Enzymreader Behringwerke, 410 nm.

20

35

Berechnungsbeispiel: negative Kontrolle 0.050 positive Kontrolle 0.600 (0.050 + 0.600/2) = 0.325

25 Absorptionsratio:

weniger als 2,5 negativ
zwischen 2.5-5 Annahme von HIV-AK
bis low-level
größer als 5-11 high level

30 Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

Mittelwert der 5 Seren der Normalpersonen: 0.058 Mittelwert der 5 seropositiven/viruspositiven Seren: 2.7 Mittelwert der 5 seropositiven/virusnegativen Seren: 1.85

1 Beispiel 10

Immuncytochemischer Assay

5 Zellen werden mit einem nicht markierten Antiköprer reaktiviert, gewaschen, in chamber slides transferiert und auf dünn aufgetragenes Medium (von Beispiel 3) angesetzt und fixiert. Die zu untersuchenden zellen werden mit 50 ,ug/ml L-Lysin oder mit carriergebundenem Fluoreszenzfarbstoff (von 10 Beispiel 2) vorbehandelt. Ein Überschuß der L-Lysin Bindungskapazität wird nach 10 Minuten mit 1 bis 2 Tropfen (25,ul bis 50,ul) Blockierungslösung (sterile Molke) verhindert. Anschließend werden die Zellen mit Medium gewaschen, eine Stunde in feuchter Kammer mit einem 15 erfindungsgemäß fluoreszenzmarkierten Antikörper oder mit einem nach üblichen Verfahren markierten Antikörper bei RT oder 37°C inkubiert (die Inkubationstemperatur hängt von der Art des Antikörpers ab), danach wieder mit Medium gewaschen und unter dem Mikroskop in den chamber slides untersucht.

20

Beispiel 11

Direkte und indirekte Membran-Immunfluoreszenz

25

Mit den Verfahren der direkten und indirekten Membran-Immunfluoreszenz kann Biopsie-Material, insbesondere Lymphknoten, sofort untersucht werden.

Für das direkte Test-Verfahren werden frische humane Lymphknoten mit einem Tropfen eines erfindungsgemäß fluoreszenzmarkierten und zusätzlich komplementverstärkten humanen monoklonalen Antikörpers beschickt, 10 Minuten inkubiert und mit physiologischer, steriler Kochsalzlösung

35 gewaschen.

Beim indirekten Test-Verfahren werden erfindungsgemäß hergestellte, jedoch keine Fluoreszenz aufweisende, komplementverstärkte, humane monoklonale Antikörper mit fluoreszenzmarkiertem Anti-Ig sichtbar gemacht.

1

5

10

20

25

Patentansprücne

- Verfahren zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
- a) Isolierung und Aufbereitung von antigenpräsentierenden Zellen, T_H-Zellvorläufern und B-Zellvorläufern aus tumorinfiltrierten, mit prokaryontischen oder eukaryontischen Erregern, insbesondere Viren, infizierten oder eine erbliche Krankheit aufweisenden Personen,
- b) Aktivierung der T_H-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer von a) durch Anbindung an die antigenpräsentierenden Zellen von a),
 - c) Isolierung und Aufbereitung von B-Zellen aus tumorinfiltrierten, mit prokaryontischen oder eukaryontischen Erregern, insbesondere Viren, infizierten, eine erbliche Krankheit aufweisenden oder gesunden Personen,
 - d) Aktivierung der B-Zellen von c) durch Anbindung an die antigenaktivierten T_H-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer von b), und
 - e) Klonierung der aktivierten B-Zellen von d).
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
 die antigenpräsentierenden Zellen aus der
 Pleuraflüssigkeit und die T_H-Zellvorläufer,
 B-Zellvorläufer und B-Zellen aus Venenblut isoliert
 werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufbereitung der isolierten antigenpräsentierenden Zellen und der isolierten B-Zellen eine Proliferations-Stimulierung der Zellen umfaßt.

5

4. Verwendung der nach dem Verfahren von Anspruch 1 hergestellten humanen monoklonalen Antikörpern zur Diagnose bei Tumor-, erblichen oder durch prokaryontische oder eukaryontische Erreger, insbesondere Viren, verursachten Erkrankungen.

15

10

20

25

30

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT /EP 90/00976

| I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) * | | | | |
|---|--|---|-------------------------------|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and "FC | | | | |
| 7 L | | | • | |
| | Cl. 5 C 12 N 5/24, A 6 | 1 K 39/395 | · | |
| II. PIELDE | | · | | |
| Classification | Minimum Document | <u></u> | | |
| | : | Classification Symbols | | |
| Int. | Cl.5; C 12 N | | | |
| | i | | | |
| | San and the Country of the Country o | and Malayan Bassan antalian | | |
| | Documentation Searched other the to the Extent that such Documents | are included in the Fields Searched ^a | | |
| | · | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| III. DOCU | MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | |
| Category * | Citation of Document, 11 with Indication, where appr | oprists, of the relevant passages 18 | Relevant to Claim No. 13 | |
| 1 | | | | |
| Y | Journal of Immunicologica | al Methods, | 1-4 | |
| | Vol. 100,1987. | | | |
| ; | Keith James et al.: | "Human monoclonal | | |
| į | antibody production (| | | |
| | future prospects", se | ee page 5 - page 40 | | |
| | see page 30. | | | |
| Y | Datont Abetweets of Tone | - 11-1 12 115 0467 | 2 | |
| 1 | Patent Abstracts of Japa abstract of JP 62-16 | | 2 | |
| | pub. 20.07.1987 | 3000, | | |
| | MITSUBISHI CHEM IND | LTD ET AL. | | |
| | | | | |
| Y | TIBTECH , Vol., June 198 | | 1,3,4 | |
| | baeck: "In vitro imm | | | |
| | production of murine | | | |
| | clonal antibodies: p | | | |
| | see page 147-page 15 see the whole docume | | | |
| į | see the whole docume | | ļ | |
| | | | · | |
| | • | | | |
| | · | | | |
| | ! | | ļ | |
| * Specie | of categories of cited documents: 10 | "T" later document published after t | he international filling date | |
| | tument defining the general state of the art which is not saidered to be of particular relevance | or priority date and not in conflicted to understand the principle | | |
| "E" earl | lier document but published on or after the international | invention "X" document of particular relevant | ce; the claimed invention | |
| | ng data cument which may throw doubts on priority claim(s) or | cannot be considered novel or involve an inventive step | cannot be considered to | |
| whi | ich is cited to establish the publication date of another ition or other special reason (as specified) | "Y" document of particular relevant cannot be considered to involve | te; the claimed invention | |
| | tument referring to an oral disclosure, use, exhibition or earns | document is combined with one ments, such combination being | or more other such docu- | |
| -P- doc | current published prior to the international filing date but | in the art. | | |
| later than the priority data claimed "å" document member of the same patent family | | | | |
| Date of the Actual Completion of the International Search Date of Mailing of this International Search Report | | | | |
| | September 1990 (28.09.90) | 9 October 1990 (0 | | |
| 20 3 | | | | |
| Internation | nel Searching Authority | Signature of Authorized Officer | | |
| EURO | PEAN PATENT OFFICE | | • . | |
| İ | | | | |

| III. SOCUMENTS CONSIDERED TO SE RELEVANT (CONTINUED PROM THE SECOND SHEET) | | | | | | |
|--|--|-------------------------|--|--|--|--|
| Catagory * | Citation of Constraint, with estimator, where appropriate, of the resource or engine | I Asserted to Claim No. | | | | |
| A | US,A,4444887 (MICHAEL K.HOFFMAN) 24 April 1984 see claims | 1 | | | | |
| A | WO,A1, 8905308 (GESELLSCHAFT FÜR) BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH) 15 June 1989. see the whole document. | 1 | | | | |
| A | EP,A2, 0118893 (SLOAN-KETTERING INSTITUTE FO CANCER RESEARCH) 19 September 1984, see the whole document. | R 1 · | | | | |
| A | WO,A1, 8807077 (THE CHILDREN'S HOSPITAL, INCORPORATED) 22 September 1988 see the whole document. | 1,3 | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| ļ | | İ | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| . ! | | , | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | · | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| 1 | | 1 | | | | |

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.PCT/EP 90/00976

SA

38039

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 29/08/90

The European Patent office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| . Publication | Patent family | | Publication | |
|---------------|----------------------------------|---|--|--|
| date | member(s) | | date | |
| 24/04/84 | NONE | | | |
| 15/06/89 | DE-A- | 3827145 | 15/06/89 | |
| | EP-A- | . 0321749 | 28/06/89 | |
| 19/09/84 | CA-A- | 1242158 | 20/09/88 | |
| | JP-A- | 60012973 | 23/01/85 | |
| | US-A- | 4693966 | 15/09/87 | |
| 22/09/88 | AU-D- | 1363088 | 10/10/88 | |
| | EP-A- | 0348413 | 03/01/90 | |
| | | • , | - | |
| | | | . • | |
| | 24/04/84 15/06/89 19/09/84 | 24/04/84 NONE 15/06/89 DE-A- EP-A- 19/09/84 CA-A- JP-A- US-A- 22/09/88 AU-D- | 24/04/84 NONE 15/06/89 DE-A- 3827145 EP-A- 0321749 19/09/84 CA-A- 1242158 JP-A- 60012973 US-A- 4693966 22/09/88 AU-D- 1363088 EP-A- 0348413 | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 90/00976

| | | | | | |
|------------------------|---|---|--|---|--|
| | | | ehreren Klassifikationssymboler, sind alle anzugeb | en) * | |
| Nach Int.Cl. | C 12 N | olen Patentklassifikation (IPC) oder nach der 5/24, A 61 K 39/395 | r nationalen Klasssifikation und der IPC | | |
| II. RE | CHERCHIERTE | SACHGEBIETE | | | |
| | | Recherchierter Mi | ndestprüfstoff ⁷ | | |
| Klassiti | Klassifikationssystem Klassifikationssymbole | | | | |
| Int.Cl. | | , | , | | |
| | | C 12 N | | | |
| | | | m Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, s nter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸ | oweit diese | |
| | | | | | |
| III. EIN | ISCHLÄGIGE V | /ERÖFFENTLICHUNGEN ⁸ | | | |
| Art • | Kennzeichnu | ng der Veröffentlichung ¹¹ ,soweit erforderlic | h unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹² | Betr. Anspruch Nr. ¹³ | |
| Y | Ke pro | l of Immunological Method ith James et al.: "Human oduction Current status a ospects", siehe Seite 5 - ehe Seite 30 | monoclonal antibody nd future | 1-4 | |
| Y | Zusamme | Abstracts of Japan, Band enfassung von JP 62-16368 ISHI CHEM IND LTD ET AL. | 12, Nr 5, C467, 6, publ 1987-07-20 | 2 | |
| Y | vit hum sie | d, Band., Juni 1986 Carl a tro immunization for produ man monoclonal antibodies whe Seite 147 - Seite 153 sgesamt | uction of murine and : present status", | 1,3,4 | |
| | 1 . | *** | | | |
| "A" Ve de "E" ål | ** Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist | | | | |
| io N | veifelheft ersch ntlichungsdatur annen Veröffent | die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch einen zu lassen, oder durch die das Veröf- n einer anderen im Recherchenbericht ge- tlichung belegt werden soll oder die aus ein- nderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt | "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutun te Erfindung kann nicht als neu oder auf er keit beruhend betrechtet werden """ Veröffentlichung von besonderer Bedeutun te Erfindung kann nicht als auf erfinderisci | finderischer Tätig- g, die beenspruch- | |
| ei | | die sich auf eine mündliche Offenberung, sine Ausstellung oder andere Maßnahmen | ruhend betrachtet werden, wenn die Veröffe einer oder mehreren anderen Veröffentlich gorie in Verbindung gebracht wird und dies | natichung mit ungen dieser Kete- | |
| tu | röflantlichung, m, sbor nach de cht worden ist | die vor dem internationalen Anmeldeda- em beanspruchten Prioritätsdatum veröffent- | einen Fochmenn naheliegend ist - "A" Veröffentlichung, die Mitglied derseiben Pa | tentfamilie ist | |
| | CHEINIGUNG | | | | |
| Datum d | les Abschlusses | der internationalen Recherche | Absendedatum des Internationalen Recherchenbe | _ • | |
| 28. S | eptember | 1990 | | 09,00, 1990 | |
| Internet | ionale Recherch | | Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten MISS D. | | |
| | Eur | opäisches Palentamt | 1 | 1. M. A . 1. W. P. F. E. V.] | |

| | CHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2) Kennzeichnung der Veroffentlichung, soweit erforderlich unter Angebe der maßgeblichen Teile | Betr. Anspruch Nr |
|---|--|-------------------|
| | US, A, 4444887 (MICHAEL K. HOFFMANN) 24 April 1984, | 1 |
| | Siehe Ansprüche | |
| | | |
| | | 1 |
| | WO, A1, 8905308 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH) | • |
| | 15 Juni 1989, | |
| | siehe Dokument insgesamt | |
| | | |
| | EP, A2, 0118893 (SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 19 September 1984, siehe Dokument insgesamt | 1 |
| | · | |
| | NO AL CONTOTT (THE CHILDSHIE HOSPITAL | 1,3 |
| | WO, A1, 8807077 (THE CHILDREN'S HOSPITAL, INCORPORATED) 22 September 1988, siehe Dokument insgesamt | |
| | | |
| | · | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | ļ |
| | | |
| | | } |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| ٠ | | · |
| | | |
| | | |
| | | |

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.PCT/EP 90/00976

SA

38039

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben. Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 29/08/90 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| US-A- 4444887 | 24/04/84 | KEINE | | |
| WO-A1- 8905308 | 15/06/89 | DE-A- EP-A- | 3827145 0321749 | 15/06/89 28/06/89 |
| EP-A2- 0118893 | 19/09/84 | CA-A- JP-A- US-A- | 1242158 60012973 4693966 | 20/09/88 23/01/85 15/09/87 |
| WO-A1- 8807077 | 22/09/88 | AU-D- EP-A- | 1363088 0348413 | 10/10/88 03/01/90 |

) }